

BEST AVAILABLE COPY

PCT/CN2004/000863

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

REC'D 26 OCT 2004

WIPO

PCT

申 请 日： 2003.09.05

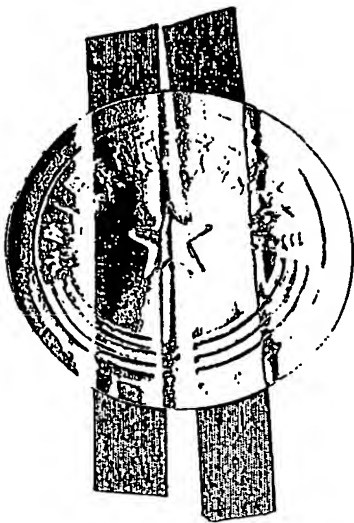
申 请 号： 03156224.8

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 抗单股正链RNA病毒人工合成的含C p G 单链脱氧寡核苷酸

申 请 人： 长春华普生物技术有限公司

发明人或设计人： 王丽颖、包木胜、于永利



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2004 年 8 月 20 日

- 1、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。
- 2、按照权利要求 1 所述的单链脱氧寡核苷酸，它们的磷酸二酯键可以是非硫化、部分硫化或全部硫化的。
- 3、按照权利要求 1 所述的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，它们具有 SEQ ID NO: 1-所示的序列。
- 4、按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸用于诱生细胞产生抗单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒物质的用途。
- 5、按照权利要求 1-3 中任一项所述的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸用于由单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的传染性疾病的治疗和预防作用。
- 6、用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的传染性疾病的技术方法和技术设想。

抗单股正链 RNA 病毒人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

发明领域

本发明涉及人工合成的抗单股正链 RNA 病毒含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，特别是涉及抗 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒的含 CpG 单链脱氧核苷酸。本发明还涉及含 CpG 单链脱氧核苷酸对单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的传染性疾病的治疗和预防作用以及用含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的传染性疾病的技术方法和技术设想。

发明背景

近年来的研究表明，多种具有 CpG 结构的细菌和病毒 DNA 对人的免疫系统是危险信号，可激活多种免疫细胞启动机体的抗病毒机制。CpG 是由胞嘧啶和鸟嘌呤通过磷酸连接成的二核苷酸，C 代表胞嘧啶，G 代表鸟嘌呤，p 代表磷酸。进一步的研究表明，含 CpG 的人工合成的脱氧核糖核酸寡核苷酸 (CpG ODN) 也可激活多种免疫细胞启动机体的抗病毒机制。

SARS 的病原体 SARS 病毒是一种变异的冠状病毒，属有包膜的单股正链 RNA 病毒 (Christian Drosten, Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome The New England Journal Of Medicine, 2003, 348:19; Paul A. Rota, et al, Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome Science, Vol. 300, Issue 5624, 1394-1399, May 30, 2003)。丙型肝炎的病原体丙型肝炎病毒也是一种有包膜的单股正链 RNA 病毒 (Lindenbach, B. D., and C. M. Rice. 2001. *Flaviviridae: the viruses and their replication*, p. 991-1041. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, vol. 1. Lippincott/The Williams and Wilkins Co., Philadelphia, Pa)。丙型肝炎病毒属黄病毒科病毒。黄病毒科的另外两种病毒，登革热病毒 (Wei-Kung Wang, Su-Ru Lin, Chao-Min Lee, Chwan-Chuen King, and Shan-Chwen Chang Dengue Type 3 Virus in Plasma Is a Population of Closely Related Genomes: Quasispecies Journal of Virology, May 2002, p. 4662-4665, Vol. 76, No. 9) 和日本脑炎病毒 (Sang-Im Yun, Seok-Yong Kim, Charles M. Rice, and Young-Min Lee Development and Application of a Reverse Genetics System for Japanese Encephalitis Virus Journal of Virology, June 2003, p. 6450-6465, Vol. 77, No. 11) 也都是有包膜的单股正链 RNA 病毒。

发明内容

发明概述

本发明的目的之一是提供人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸特别是可刺激人外周血细胞产生抗单股正链 RNA 病毒物质的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成，其磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。优选地，本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 1 所示的序列。

本发明的目的之二是提供本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒的作用。



本发明的目的之三是提供本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸对单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的传染性疾病的治疗和预防的作用。

本发明的目的之四是提供用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的传染性疾病的的技术方法和设想。

另外，需要指出的是，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本发明的其它具有实质性特点的方面和创造性的有益效果对本领域的普通技术人员来说是可以直接推知的。

具体实施方式

在本发明的上下文中，所使用的术语除非另外说明，一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。特别地，下列术语具有如下的含义：

优选地，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有如下所示的序列：

SEQ ID NO: 1

DVAX-1 : 5' -TCgTCgggTgCgACgTCgCAggggggg -3'

其中的磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。

本发明的CpG单链脱氧寡核苷酸可通过已知的方法生产，例如采用固相亚磷酰胺三酯法进行生产。以下的实施例详细地例举了一种生产本发明的人工合成的含CpG单链脱氧寡核苷酸的方法。

在预防和治疗由单股正链RNA病毒特别是SARS病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的人传染性疾疾病时，人工合成的含CpG单链脱氧寡核苷酸的一次用药剂量为1-5000微克。

本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用方式包括单独应用或与其它抗单股正链 RNA 病毒药物或疫苗联合使用。

应用方式包括粘膜（包括呼吸道、消化道和泌尿生殖道黏膜）表面应用，滴眼，皮下、肌肉注射应用，胃肠应用，腹腔应用，静脉注射等常用的方式应用。

下面结合具体的制备实施例和生物学效果实施例，并参照附图进一步详细地描述本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

实施例

在如下实施例中，未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法，例如合成采用固相亚磷酰胺三酯法。在如下实施例中，所用试剂的来源、商品名和/或有必要列出其组成成分者，均只标明一次。在其后所用相同试剂如无特殊说明，不在赘述上述内容。

实施例 1 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的制备

采用固相亚磷酰胺三酯法合成人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。

1、试剂和材料：

三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)、可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)、DMT(二甲氧基三苯甲基)、四氮唑活化剂、乙酸酐、N-甲基咪唑、A、T、C、G 四种核苷酸单体、ABI DNA 合成仪、高效液相色谱层析仪等

2、方法：

脱保护基

用三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)脱去连结在可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)上的核苷酸的保护基团二甲氧基三苯甲基(DMT), 获得游离的 5'-羟基端, 以供下一步缩合反应。

活化

将亚磷酸胺保护的核苷酸单体与四氮唑活化剂混合并进入合成柱, 形成亚磷酸胺四唑活性中间体(其 3'-端已被活化, 但 5'-端仍受 DMT 保护), 此中间体将与可控多孔玻璃上的已脱保护基的核苷酸发生缩合反应。

连接

亚磷酸胺四唑活性中间体遇到可控多孔玻璃上已脱保护基的核苷酸时, 将与其 5'-羟基发生亲合反应, 缩合并脱去四唑, 此时合成的寡核苷酸链向前延长一个碱基。

封闭

缩合反应后为了防止连在可控多孔玻璃上的未参与反应的 5'-羟基在随后的循环反应中被延伸, 常通过乙酰化来封闭此端羟基, 一般乙酰化试剂是用乙酸酐和 N-甲基咪唑等混合形成的。

氧化

缩合反应时核苷酸单体是通过亚磷酸酯键与连在可控多孔玻璃上的寡核苷酸连接, 而亚磷酸酯键不稳定, 易被酸、碱水解, 此时常用碘的四氢呋喃溶液将亚磷酸酯转化为磷酸三酯, 得到稳定的寡核苷酸。

经过以上五个步骤后, 一个脱氧核苷酸就被连到可控多孔玻璃的核苷酸上, 同样再用三氯乙酸脱去新连上的脱氧核苷酸 5'-羟基上的保护基团 DMT 后, 重复以上的活化、连接、封闭、氧化过程即可得到一 DNA 片段粗品。最后对其进行切割、脱保护基(一般对 A、C 碱基采用苯甲酰基保护; G 碱基用异丁酰基保护; T 碱基不必保护; 亚磷酸用膦乙基保护)、纯化(常用的有 HAP, PAGE, HPLC, C18, OPC 等方法)、定量等合成后处理即可得到符合实验要求的寡核苷酸片段。

未硫化的 CpG 单链脱氧寡核苷酸在 ABI 3900 DNA 合成仪上合成; 全硫化及部分硫化 CpG 单链脱氧寡核苷酸的合成采用置换法, 在 ABI 394 DNA 合成仪上合成。

实施例 2、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗单股正链 RNA 病毒 SARS 病毒的作用

1、人外周血单个核细胞的分离

(1)、材料:

肝素抗凝的人全血: 长春市中心血站。

聚蔗糖-泛影葡胺: 比重 1.077 ± 0.001 , 北京鼎国生物技术有限公司。

细胞培养常用的仪器设备: 低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

RPMI1640 培养液:

含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640(GIBCOBRL)	10.4 克
碳酸氢钠	2.0 克
庆大霉素	10 万单位
加三蒸水至体积 1000 毫升	

0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

灭活胎牛血清: 胎牛血清(Invitrogen) -20°C 取出, 4°C 冰箱融化后, 56°C 水浴 30min。

10%胎牛血清的 RPMI1640:

灭活的小牛血清	10 毫升
RPMI 1640 培养液	90 毫升



Hank's 液（无钙离子、镁离子）的配制：

氯化钠	8.0 克
氯化钾	0.4 克
磷酸氢二钠（带一个结晶水）	0.06 克
磷酸二氢钾	0.06 克
碳酸氢钠	0.35 克
葡萄糖	1.0 克
酚红	0.02 克

加入双蒸水至 1000 毫升。

将上列成分混合后溶化，8 磅 15min 灭菌，4℃冰箱保存。临用时用 7.4% NaHCO₃ 调 pH 至 7.3~7.6。

2%台酚兰染色液：

台酚兰	2 克
生理盐水	100 毫升

(2)、方法：

将肝素抗凝的人外周血沿管壁缓慢加于比重为 1.077±0.001 的聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液面上，分离液与肝素抗凝外周血的比例约为 2:1。

水平离心机离心，1,000xg 15—20min，离心后管内液体分为 3 层，用吸管吸取白色云雾层液体带，置入另一管中。

加入等倍体积的 Hank's 液（无血清），混匀，800—1,000 xg，离心 15min，弃上清。用 Hank's 液离心洗细胞两次。

末次离心后，弃上清，加入 2ml 10%FCS RPMI1640 完全培养液，重悬细胞。

取一滴细胞悬液稀释后做细胞计数。数四个大方格内的细胞总数，单个核细胞浓度(细胞数 / 1 毫升细胞悬液) = 4 个大方格内细胞总数 / 4 × 10⁴ × 2 (稀释倍数)。

2、获取 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清

将含人外周血 PBMC 的 10%FCS RPMI1640 完全培养液接种于 12 孔培养板，每孔 2ml，细胞浓度为 4×10⁶ 细胞/ml，加滤过除菌的 CpG ODN (DVAX-1)，终浓度分别为 25μg/ml，12.5μg/ml，6.25μg/ml 和 3.13μg/ml。设培养液对照（不加 CpG ODN）。37℃、5%CO₂ 条件下培养 48 小时，收集上清，置-20℃备用。

3、抗 SARS 病毒实验

本实验在中国疾病预防控制中心病毒预防控制所完成。

(1)、材料：

非洲绿猴肾传代细胞 (VERO E6)：中国疾病预防控制中心病毒预防控制所。冠状病毒 Sino-5 分离株 (SARS 病人急性血清 04 号标本)：由北京佑安门医院提供，中国疾病预防控制中心病毒预防控制所鉴定保存。

阳性对照药物：远策素 (重组人干扰素α2b)，100 万 IU/支，文号：国药准字 S19990013，批号：000503A，北京远策药业有限责任公司出品。

(2)、方法

将 VERO E6 细胞接种于 96 孔培养板，细胞的浓度为 4×10⁵/ml，37℃、5%CO₂ 培养 24 小时，吸弃培养液。加入 100 TCCID₅₀ 冠状病毒 Sino-5 分离株病毒，37℃、5%CO₂ 培养 2 小时，弃掉病毒液。加入 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清，每孔 100 μl，设两个复孔。设重组人干扰素α2b 和培养液对照，细胞对照和病毒对照，37℃、5%CO₂ 培养 6 天。

在显微镜下观察细胞病变 (CPE)，出现 25% 病变记 “+”，出现 26~50% 病变记 “++”，出现 51~75% 病变记 “+++”，出现 76~100% 病变记 “++++”。在观察 CPE 结束后，每孔加 100 μ L 0.5% 结晶紫染色液 (结晶紫 0.5 克，NaCl 0.85 克，溶于 50ml 无水乙醚，3ml 甲醛，47ml 蒸馏水中)，37℃、5% CO₂ 培养 15 分钟。流水冲洗。每孔加入 100 μ l 脱色液 (乙二醇单甲醚 50ml，蒸馏水 50ml)。室温振荡 2 小时后，用 ELISA 检测仪测 OD (492nm) 值。

(3)、结果

● CPE 法实验结果：

25 μ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:160 对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 有抑制效果

12.5 μ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 有抑制效果

6.25 μ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:40 对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 有抑制效果

重组人干扰素 α 2b：在稀释到 5 万单位以上对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 有抑制效果。
不含 CpG ODN 的培养基上清对照冠状病毒 (Sino-5 分离株) 没有抑制效果。

● 结晶紫染色法实验结果：

25 μ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 有抑制效果

12.5 μ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 有抑制效果

6.25 μ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:20 对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 有抑制效果

重组人干扰素 α 2b：在稀释到 5 万单位以上对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 有抑制效果。
不含 CpG ODN 的培养基上清对照冠状病毒 (Sino-5 分离株) 没有抑制效果。

上述结果表明，CpG ODN (DVAX-1) 刺激的人外周血单个核细胞诱导上清中含抗单股正链 RNA 病毒 SARS 病毒的物质；CpG ODN (DVAX-1) 可通过刺激细胞产生抗病毒物质发挥抗单股正链 RNA 病毒 SARS 病毒的作用。

实施例 3、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗单股正链 RNA 病毒登革热病毒的作用

1、人外周血单个核细胞的分离

同实施例 2。

2、获取 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清

同实施例 2。

3、抗登革热病毒实验

(1)、材料：

登革热病毒 (D2V strain NGC)：用 C6/36 昆虫细胞 (ATCC) 制备。

Vero 细胞：来自美国 ATCC。

10%FCS RPMI1640 完全培养液：同实施例 2。

(2)、方法

将 200 μ l VERO E6 细胞悬液接种于 96 孔培养板，细胞的浓度为 4×10^5 /ml，37℃、5%CO₂培养 24 小时，吸弃培养液。加入 100 TCCID₅₀ 登革热病毒，37℃、5%CO₂培养 2 小时，弃掉病毒液。加入 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清，每孔 100 μ l，设三个复孔。设细胞对照和病毒对照，37℃、5%CO₂培养 8 天。在显微镜下观察细胞病变 (CPE)，出现 25%病变记“+”，出现 26-50%病变记“++”，出现 51-75%病变记“+++”，出现 76-100%病变记“++++”。

(3)、结果 (CPE 法)

25 μ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对登革热病毒有抑制效果

12.5/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对登革热病毒有抑制效果

6.25/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:40 对登革热病毒有抑制效果

不含 CpG ODN 的培养基上清对登革热病毒没有抑制效果。病毒对照的细胞全部发生病变。

上述结果表明，CpG ODN (DVAX-1) 刺激的人外周血单个核细胞诱导上清中含抗单股正链 RNA 病毒登革热病毒的物质；CpG ODN (DVAX-1) 可通过刺激细胞产生抗病毒物质而发挥抗单股正链 RNA 病毒登革热病毒的作用。

实施例 4、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗单股正链 RNA 病毒日本脑炎病毒的作用

1、人外周血单个核细胞的分离

同实施例 2。

2、获取 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清

同实施例 2。

3、抗日本脑炎病毒实验

(1)、材料：

日本脑炎病毒：长春生物制品研究所。

BHK-21 细胞：来自内蒙生物制药厂。

10%FCS RPMI1640 完全培养液：同实施例 2。

(2)、方法

将 200 μ l BHK-21 细胞悬液接种于 96 孔培养板，细胞的浓度为 4×10^5 /ml，37℃、5%CO₂培养 24 小时，吸弃培养液。加入 100 TCCID₅₀ 日本脑炎病毒，37℃、5%CO₂培养 2 小时，弃掉病毒液。加入 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清，每孔 100 μ l，设三个复孔。设细胞对照和病毒对照，37℃、5%CO₂培养 4 天。在显微镜下观察细胞病变 (CPE)，出现 25%病变记“+”，出现 26-50%病变记“++”，出现 51-75%病变记“+++”，出现 76-100%病变记“++++”。

(3)、结果 (CPE 法)

25 μ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:160 对日本脑炎病毒有抑制效果。

12.5/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对日本脑炎病毒有抑制效果

6.25/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:40 对日本脑炎病毒有抑制效果

不含 CpG ODN 的培养基上清对日本脑炎病毒没有抑制效果。病毒对照的细胞全部发生病变。

上述结果表明, CpG ODN (DVAX-1) 刺激的人外周血单个核细胞诱导上清中含抗单股正链 RNA 病毒日本脑炎病毒的物质; CpG ODN (DVAX-1) 可通过刺激细胞产生抗病毒物质而发挥抗单股正链 RNA 病毒日本脑炎病毒的作用。

序列表

<110> 长春华普生物技术有限公司
 <120> 抗单股正链 RNA 病毒人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

<160> 107
 <170> Patent In version 3.1

<210> 1
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<400> 1
 tcgtcgggtg cgacgtcgca ggggg g

26

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.